# *Tolypocladium Inflatum* – der weltberühmte Pilz aus dem Ötztal

HANS W. LACK

## Abstract

### Tolypocladium inflatum – the famous fungus from Ötztal

The discovery of the imperfect fungus *Tolypocladium inflatum*, the isolation and characterisation of the peptide ciclosporine from its mycelium, and the first application of this substance in transplantation medicine are briefly described in an historical context. The use of ciclosporine continues to be the golden standard in modulation of the human immune response after transplantation.

## Key words

*Tolypocladium inflatum*, ciclosporine, transplantation, modulation of immune response, history.

Stapfia 75,
zugleich Kataloge des OÖ. Landesmuseums,
Neue Folge Nr. 164 (2001), 251-258

## 1. Kampf um Leben und Tod

Erstmals ein Medikament am Krankenbett anzuwenden, ist immer ein Abenteuer mit ungewissem Ausgang, denn trotz aller vorangegangener Tierversuche ist nie letzte Gewißheit über die Wirkung auf den menschlichen Organismus gegeben. Dabei muß die Auswahl der Probanden stets besonders sorgfältig geschehen und der Krankheitsverlauf minutiös verfolgt werden.

Bei der erstmaligen Anwendung von zwei besonders wirksamen Substanzen wählte man Patienten, deren Tod nach menschlichem Ermessen unmittelbar bevorstand: Penicillin verabreichte man im Jahre 1941 erstmals an einen an Blutvergiftung leidenden, hoch fiebernden jungen Mann in Oxford, den die Ärzte bereits aufgegeben hatten (MÜLLER-JAHNCKE & FRIEDRICH 1996). Wie erhofft fiel seine stark erhöhte Körpertemperatur rasch ab, stieg aber wieder an. Da kein weiteres aus dem Schimmel *Penicillium* gewonnenes Penicillin vorhanden war, mußte man das im Harn des Patienten ausgeschiedene Penicillin mühsam isolieren und erneut verabreichen. Das brachte zwar eine zweite Senkung des Fiebers, der aber ein erneutes rasches Ansteigen der Körpertemperatur folgte. Nach einer letzten Verabreichung der geringen verbliebenen Menge Penicillin, nahm die Sepsis ihren normalen Verlauf und der Patient verstarb.

Zweiundvierzig Jahre später kämpfte wieder in Oxford ein junger Mann um Leben und Tod. Er litt an schwerer Herzinsuffizienz und mit seinem baldigen Ableben war zu rechnen. Man entschloss sich, ihm das Herz eines gehirntoten Unfallopfers einzupflanzen, wohl wissend, dass damit lediglich eine kurzfristige Verlängerung seines Lebens möglich war. Aber anders als bei der ersten Herztransplantation beim Menschen im Jahre 1967 durch Christiaan BARNARD, dessen Patient nach nur wenigen Wochen verstorben war, erhielt dieser Organempfänger das bis dahin nur im Tierversuch bzw. bei Nierentransplantationen getestete Ciclosporin. Wie erhofft, überlebte er etwas länger, starb aber dann ebenfalls. Bei der Obduktion wurde die Todesursache festgestellt: es war nicht wie bei allen früheren Transplantationspatienten die Abstoßung des eingepflanzten Organs (Abb. 1), sondern ein progressives Nierenversagen. Damit war die Tür geöffnet zu einem neuen Feld der Forschung - der Transplantationsmedizin.

## 2. Der weltberühmte Pilz aus dem Ötztal

Begonnen hatte die Geschichte des Ciclosporins ganz bescheiden im Juni 1957 bei Obergurgl in Tirol. Walter GAMS, damals Student an der Universität Innsbruck, sammelte Torfproben und untersuchte sie auf mikroskopisch kleine Pilze. Mehrere davon waren ihm unbekannt, sie erhielten provisorische Namen, wurden gezeichnet und beschrieben, im Labor kultiviert und weiter untersucht. Einen seiner Mikropilze nannte GAMS *Trichoderma inflatum* und hielt die Form seines Mycels und seiner Sporangien in einer einfachen, aber präzisen Strichzeichnung fest. Zwei Jahre später reichte GAMS seine Dissertation 'Die Bodenpilze im zentralalpinen Rohhumus' (GAMS 1959) zur Approbation an der Universität Innsbruck ein. Weder der Dekan, noch die Gutachter, noch der Autor selbst ahnten, welche folgenschwere Entdeckung diese Arbeit enthielt. Da die österreichische Promotionsordnung die Ablieferung von lediglich drei Exemplaren der Disser-

tation vorsieht, ist dieses Werk eine große Seltenheit, je ein Exemplar ist an der Österreichischen Nationalbibliothek in Wien und an der Universitätsbibliothek Innsbruck vorhanden.

Die ordnungsgemäße Veröffentlichung eines Teils dieser Ergebnisse erfolgte erst zwölf Jahre nach der Promotion von Walter GAMS, der damals bereits als Mykologe am Centraalbureau voor Schimmelcultuuren in Baarn in Holland tätig war. In dem Rijksherbarium in Leiden herausgegebenen Zeitschrift 'Persoonia' berichtete er über *Tolypocladium inflatum* GAMS, wie er nach weiteren Untersuchungen seine Entdeckung aus Obergurgl nannte, und veröffentlichte Beschreibung und Strichzeichnung (GAMS 1971). Auch zu diesem Zeitpunkt konnte niemand etwas über die Bedeutung dieses Mikropilzes ahnen.

## 3. Die Überraschung in Basel

In der Firma Sandoz in Basel war ein Forschungsteam auf der Suche nach Substanzen, die das Wachstum von humanpathogenen Pilzen hemmen. Es nahm an,

**Abb.1.**

**Endomyokardbiopsie bei einer schweren Abstoßungsreaktion nach Herztransplantation. — Deutsches Herzzentrum Berlin.**

dass bodenbewohnende Pilze als mögliche Produzenten in Frage kämen. So bat man Walter GAMS um Überlassung von Kulturen, vermehrte sie und testete Rohextrakte an Labortieren, die man mit humanpathogenen Pilzen infiziert hatte. Dieser Weg erwies sich allerdings als Sackgasse, und die Arbeitsgruppe stand unmittelbar vor ihrer Auflösung.

Glücklicherweise hatte man mit sehr großen Testreihen gearbeitet. Zum großen Erstaunen wurde bekannt, dass es jenen nierentransplantierten Labortieren deutlich besser ging, die einen Rohextrakt von *Tolypocladium inflatum* erhalten hatten. Was zuerst als Laborkuriosität angesehen wurde, bestätigte sich bei vielen Wiederholungen des Experiments. Zur grenzenlosen Verwunderung aller - der Mediziner, Biologen und Chemiker - schien es gelungen, die Immunantwort von Säugetieren auf ein Transplantat zu modulieren. Dieses Rätsel zu lösen, wurde zur großen Herausforderung des finanzstarken Pharma-Konzerns.

In mehrjähriger Arbeit gelang es einem Team von Biochemikern in Basel aus Tausenden im Rohextrakt vorhandenen Substanzen das wirksame Prinzip zu isolieren - ein zyklisches Polypeptid mit dem furchteinflößenden Namen Cyclo-[[(E)-(2S,3R,4R)-3-hydroxy-4-methyl-2-(methylamino)-6-octenoyl]-L-2-amino-butyryl-N-methylglycyl-N-methyl-L-leucyl-L-valyl-N-methyl-L-leucyl-L-alanyl-D-alanyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-leucyl-N-methyl-L-valyl], heute meist Ciclosporin A bzw. Cyclosporin A (Sandimmun ®)genannt.

Vieles ist an diesem elf Aminosäuren umfassenden, ringförmig gebauten Molekül auffällig: es umfasst 4 Moleküle N-Methyl-L-leucin (L-MeLeu) und je ein Molekül L-Alanin (L-Ala), D-Alanin (D-Ala), L-Valin (L-Val), L-Aminobuttersäure (L-Abu), Methylglycin (MeGly), N-Methyl-L-valin (L-MeVal) und eine weitere exotische Aminosäure, die damals noch von keinem anderen Organismus bekannt war - die (E)-(2S,3R,4R)-3-Hydroxy-4-methyl-L-2-(methylamino)-6-octensäure. Um die chemische Struktur des Ciclosporins zu beweisen, war eine Synthese im Reagenzglas nötig, was den brillanten Biochemikern in Basel ebenfalls gelang. Diese Prozedur erwies sich allerdings als dermaßen mühsam und teuer, dass man daran ging, den Pilz in großen Fermentern, wie man sie aus Bierbrauereien kennt, zu kultivieren. Als weiteres Problem erwies sich der extrem hydrophobe Charakter des Moleküls: man kann es oral nur in öligen Vehikeln oder in Mikroemulsionen verabreichen, die erst entwickelt werden mussten.

Da Ciclosporin nur in winzigen Mengen im Rohextrakt vorhanden war, machte man sich auf die Suche nach *Tolypocladium inflatum*-Stämmen mit höherer Konzentration von Ciclosporin. Dabei stellte die Arbeitsgruppe in Basel fest, daß der von GAMS entdeckte Pilz keineswegs nur im Ötztal vorkommt, sondern weit verbreitet ist. Besonders ciclosporinreiche Varianten fand man im südlichen Norwegen und machte sie zur Basis weiterer Untersuchungen.

Schon sehr früh hatte man einen großen Nachteil des Ciclosporins erkannt: die Substanz ist hoch nephrotoxisch, vermindert also deutlich die Nierenfunktion. Jedes transplantierte Labortier steht so zwischen zwei Übeln: ist die Ciclosporin-Dosis zu niedrig gewählt, so wird das Transplantat durch die ungebremste Immunantwort abgestoßen und das Tier stirbt, ist die Ciclosporin-Dosis zu hoch angesetzt, versagen die Nieren,

und das Tier stirbt ebenfalls. Das therapeutische Fenster ist also außerordentlich klein.

## 4. Der Wirkungsmechanismus

Nachdem durch die Transplantation in Oxford im Jahre 1983 die prinzipielle Übertragbarkeit der an Labortieren gewonnenen Daten auf den Menschen nachgewiesen worden war, konzentrierte sich die biochemische und medizinische Forschung auf die Untersuchung des Wirkmechanismus. So wurde festgestellt, daß Ciclosporin über den Dünndarm resorbiert wird, eine Halbwertszeit von 6-9 Stunden besitzt, die Bioverfügbarkeit etwa 35 % beträgt, die Substanz in der Leber verstoffwechselt wird und in Form von mehreren Stoffwechselprodukten (Metaboliten) über die Leber ausgeschieden wird, was wegen der hohen Nephrotoxizität auch der Metaboliten überraschte. Mindestens ebenso interessant erwies sich die Aufklärung des Wirkmechanismus: Ciclosporin interferiert mit Faltungsprozessen von Proteinen (möglicherweise einer Prolinisomerase) in den T-Zellen der Blutbahn und blockiert dadurch intrazelluläre Signalprozesse, was in weiterer Folge zur Hemmung der Ausschüttung von bestimmten Interleukinen, hauptsächlich dem Interleukin 2 aus den T-Lymphocyten und Helfer-T-Zellen führt. Interleukin 2 gilt heute als die potenteste Substanz im menschlichen Körper, die das Wachstum und die Zellteilung der Lymphzyten stimuliert. Durch die Gabe von Ciclosporin kann selektiv in die sogenannte Immunkaskade, die regelhafte, in Einzelschritten ablaufende Immunantwort, eingegriffen werden, was sich dadurch als lebensrettend für Transplantierte erwies, dass die T-Zellen in weit geringer Zahl als ohne dieses Medikament zu zytotoxischen Zellen reifen und das transplantierte Organ nur in geringerem Maße angreifen können. Der Empfängerorganismus ist nicht mehr zu einer schweren, gegen das Transplantat gerichteten Entzündungsreaktion fähig, wodurch schwere Abstoßungsreaktionen sehr viel seltener auftreten.

Immunsuppression ist aber reversibel: unterläßt es ein Transplantierter, Ciclosporin einzunehmen, lösen die T-Lymphocyten die Immunantwort gegen das Transplantat aus und die gefürchtete Abstoßungsreaktion beginnt. Sie ist, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, nur schwer beherrschbar und führt immer wieder zum Ableben von Transplantierten.

## 5. Die dreifache Immunsuppression

Es bedurfte weiterer Jahre intensiver Forschung bis man die heute weltweit übliche, dreifache Immunsuppression entwickelte - das sehr spezifisch wirkende Ciclosporin A kombiniert mit dem unspezifischen Mitosehemmer Azathioprin (AZA) und den ebenfalls unspezifischen Glucocorticoidsteroiden (GCs). Erst damit konnte die Organtransplantation zu einer bewährten Routinemethode werden: die Herztransplantation in der Endphase der Herzinsuffizienz, die Lungentransplantation bei schweren Formen der Mukoviszidose, Lungenemphysem und anderen schweren Lungenerkrankungen, und die Lebertransplantation bei akutem oder chronischem Leberversagen.

Trotz weltweiter Anstrengungen ist es bis heute noch nicht gelungen, eine ausgereifte Alternative für Ciclosporin zu finden, das nach wie vor direkt aus dem Pilz gewonnen wird. Das Langzeit-Management der dreifachen Immunsuppression

bleibt deshalb ein heikler Punkt für jeden Transplantierten, eine Gratwanderung zwischen Wirkung (Verhinderung der Abstoßungsreaktion) und Nebenwirkung (Schädigung der Niere). Jeder Transplantierte steht somit zeitlebens zwischen Skylla und Charybdis und muß zusammen mit dem betreuenden Arzt wie Odysseus sorgfältig zwischen diesen beiden Gefahren navigieren.

## 6. Die zweite Überraschung aus Ithaka

Pilze sind nicht nur bekannt für ihre Fähigkeit, exotische Aminosäuren zu synthetisieren, sondern auch für ihren mindestens ebenso verblüffenden Formwandel. Denn unter Pilz versteht man im landläufigen Sinn nur die sogenannte Hauptfruchtform, jene als Folge eines Sexualaktes, einer Zellverschmelzung, entstandene Struktur. Ihr stehen die Nebenfruchtformen gegenüber, bestimmte als Folge einer Zellteilung entstandene Strukturen bei Pilzen. Bei vielen Pilzen ist die gesetzmäßige Abfolge von Haupt- und Nebenfruchtformen gut bekannt, nicht aber bei allen. GAMS und die Biochemiker bei Sandoz in Basel kannten nur die Nebenfruchtform von *Tolypocladium inflatum* (Abb. 2) und vermehrten ihren Pilz vegetativ.

**Abb. 2. *Tolypocladium inflatum.* Conidiosporenträger und Conidiosporen auf Nährboden. Druck nach einer anonymen Federzeichnung aus Mycologia 88: 717 (1996). — Botanisches Museum Berlin-Dahlem, Bibliothek.**

Vor fünf Jahren gelang es einer an der Cornell University in Ithaka und am US Department of Agriculture in New York tätigen Arbeitsgruppe den rätselhaften Pilz besser zu verstehen: Auf einer Exkursion in der Nähe von New York hatten Studenten seltsam geformte Gebilde auf Käferlarven entdeckt, die sich in Kulturversuchen als Hauptfruchtformen von *Tolypocladium inflatum* erwiesen (HODGE, KRASNOFF & HUMBER 1996). Es konnte gezeigt werden, dass auch die Hauptfruchtform Ciclosporin produziert und in den Insektenkörper abgibt. Damit waren erstmals die Vermehrungszyklen umfassend verstanden, wobei man allerdings erkennen musste, dass die Hauptfruchtform bereits jahrzehntelang unter dem Namen *Cordyceps subsessilis* PETCH bekannt gewesen war.

Welche Rolle allerdings das für die Transplantierten der ganzen Welt so segensreiche Ciclosporin im Stoffwechsel von *Tolypocladium inflatum/Cordyceps subsessilis* spielt, ist bisher gänzlich unverstanden.

## 7. Epilog

Schon vier Jahre nach der ersten Anwendung von Penicillin am Menschen erhielten die Leiter der Arbeitsgruppen in Oxford gemeinsam den Nobelpreis für Medizin: es waren dies der in Schottland geborene Mediziner und Mikrobiologe Alexander FLEMING (1881-1955), der in Australien geborene Pathologe Howard Walter FLOREY (1898-1968) und der in Deutschland geborene Biochemiker Ernst Boris CHAIN (1906-1979). Ein Nobelpreis für die Väter des Ciclosporins steht noch aus.

## Danksagung

Priv. Doz. Dr. M. HUMMEL (Deutsches Herzzentrum Berlin) und Dr. N. KILIAN (BGBM Berlin-Dahlem) danke ich für die Durchsicht einer vorläufigen Fassung dieses Textes.

## Anmerkung

Dieser Artikel ist die erweiterte Fassung eines vor wenigen Monaten in der Zeitschrift Fundiert veröffentlichen Beitrags (LACK 2000).

## Literatur

GAMS H. (1959): Die Bodenpilze im zentralalpinen Rohhumus. — Innsbruck (Diss.).

GAMS H. (1971): *Tolypocladium*, eine Hyphomycetengattung mit geschwollenen Phialiden. — Persoonia **6**: 185-191.

HODGE K. T., KRASNOFF S. B. & HUMBER R. A. (1996): *Tolypocladium inflatum* is the anamorph of *Cordyceps subsessilis*. — Mycologica **88**: 715-719.

LACK H. W. (2000): Ein Pilz macht es möglich. *Tolypocladium inflatum* und Herztransplantationen. — Fundiert **1**: 66-70.

MÜLLER-JAHNCKE W.-D., FRIEDRICH C. (1996): Geschichte der Arzneimitteltherapie. — Stuttgart.

Anschrift des Verfassers:

Prof. Dr. Hans Walter LACK
Botanischer Garten und Botanisches
Museum Berlin-Dahlem
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 6-8
D-14195 Berlin
E-mail: h.w.lack@mail.bgbm.fu-berlin.de